

Untersuchungen am Menschen
zur hyaluronidasehemmenden Wirkung
der Flufenaminsäure

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
in der Zahnmedizin verfaßt und einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig - Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Ingrid Schuster
aus Köln

München 1970



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Untersuchungen am Menschen
zur hyaluronidasehemmenden Wirkung
der Flufenaminsäure

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
in der Zahnmedizin verfaßt und einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig - Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Ingrid Schuster
aus Köln

München 1970

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Professor Dr. W. Seitz

Dekan: Professor Dr. F. Holle

Tag der mündlichen Prüfung: 9.6.1970



Inhaltsverzeichnis

Pharmakologie.....	1
Eigene Untersuchungen.....	10
Methodik.....	10
Versuchsreihen.....	12
Statistische Auswertung.....	17
Zusammenfassung u. Diskussion.....	20
Literaturverzeichnis.....	23

Zur Behandlung der chronischen Polyarthrititis wurde als neue Substanz die Flufenaminsäure mit der chemischen Bezeichnung $N(\text{2,2,2-trifluoro-m-tolyl})\text{anthranilsäure}$ (Versuchsbezeichnung: CL 440, Handelsname: Arlef) entwickelt. Die Substanz ist eine schwache Carboxylsäure mit einem pH bei 7, die in polymorphen Kristallen vorliegt und ein Schmelzintervall zwischen 125 und 136 Grad hat. Das Na-Salz der Flufenaminsäure ist zu 16% wasserlöslich, die freie Säure nur in Erdnussöl leicht löslich.

Vorklinische Untersuchungen mit der Flufenaminsäure wurden an Ratten, Mäusen, Hunden und Affen durchgeführt. Die Substanz wurde ferner bezüglich ihrer Anwendbarkeit bei chronischer Polyarthrititis in folgenden Versuchsreihen geprüft und in der Dosierung und im Wirkungseffekt mit anderen Rheumamitteln verglichen:

Einfluß auf verschiedene Entzündungsmodelle

Anti-UV-Erythem-Effekt

Ein beim Meerschweinchen künstlich erzeugtes UV-Erythem wurde nach oraler Gabe von 26 mg/kg Flufenaminsäure unterdrückt. Hierbei ist das Präparat etwa 16mal stärker als Acetylsalicylsäure, 12mal stärker als Aminopyrin und 1,6mal stärker als Phenylbutazon. Steroide und Antimalariamittel beeinflussen dagegen das UV-Erythem nicht¹⁾.

Antigranulationseffekt

Ratten wurden subcutan Baumwoll-Tampons implantiert, welche das umliegende Gewebe zu Granulationsbildung reizten. Daraufhin wurde den Ratten Flufenaminsäure und Phenylbutazon oral verabreicht, um einen etwaigen hemmenden Einfluß dieser Medikamente auf das Wachstum des Granulationsgewebes feststellen zu können. Ein hemmender Effekt trat ein, die Dosen hierfür waren für beide Mittel gleich. Die Wachstumsreduktion stieg bei Erhöhung der Dosis. Ein Vergleich der Nichtsteroiden mit den Steroiden in Bezug auf die Bildung des Granulationsgewebes zeigte die bedeutend größere Wirksamkeit der letztgenannten Medikamentengruppe. Der unterschiedliche Effekt bei beiden wird als Zeichen der verschiedenar-

tigen Wirkungsweise beider Pharmaka gewertet. Als Beweis hierfür dient die bei den Nichtsteroiden ausbleibende Thymusinvolution, Nebennierenatrophy und allgemeine Wachstumshemmung²⁾.

Der antipyretische Effekt

Bei normalen Ratten konnte die Temperatur weder durch Phenylbutazon, noch durch Aspirin, noch durch Flufenaminsäure gesenkt werden.

Durch Hefe künstlich erzeugtes Fieber konnte dagegen durch alle drei Medikamente deutlich gesenkt werden, eine Dosis von 50 mg/kg Flufenaminsäure reichte für einen temperatursenkenden Effekt.²⁾

Antinociceptive Wirkung

Hier konnte kein Effekt erzielt werden, obwohl Dosen von 0,25% der LD₅₀ verabreicht wurden²⁾.

Der antiphlogistische Effekt im Arthritis-Modell

a) Bei Ratten wurde durch Freunds Adjuvant eine Polyarthritis erzeugt. Hier konnte Flufenaminsäure den Krankheitsverlauf mildern und zwar 3mal stärker als Acetylsalicylsäure und wenig stärker als Phenylbutazon³⁾.

b) Eine durch Injektion von Murphy-Lymphosarkom erzeugte Arthritis wurde ebenfalls durch Flufenaminsäure reduziert⁴⁾, desgleichen eine durch Injektion von Mycoplasma arthritidis erzeugte Polyarthritis. Ein wichtiges Symptom dieser Krankheit ist die Einschränkung der Fähigkeit der Ratten, sich an den Gitterstäben des Käfigs festzuhalten. Durch Applikation von Flufenaminsäure konnte diese Funktion um 50% verlängert werden⁵⁾.

Wirkung auf das Rattenpfotenödem

Durch Injektion von 1-Carrageenin wurde bei Ratten³⁾⁶⁾⁷⁾ ein Ödem erzeugt, das durch Flufenaminsäure wie auch durch Phenylbutazon und Aspirin unterdrückt werden konnte. Hierbei war Flufenaminsäure 2,5-9mal so wirksam wie Phenylbutazon und 7-11mal so wirksam wie Aspirin.

Weiterhin wurden etwaige Einflüsse von Flufenaminsäure auf Herz, Kreislauf und Niere geprüft.

Hierzu wurde bei narkotisierten Hunden die Kerntemperatur von 36 auf 21 Grad gesenkt. Ein Effekt auf den Herzrhythmus blieb selbst bei Dosen von 40 mg/kg aus. Auch kumulierende Dosen von 48-64 mg/kg konnten nicht für die Todesfälle verantwortlich gemacht werden, die während der Hypothermie durch Kammerflimmern oder Herzstillstand eingetreten waren.²⁾

Die Blutdruckwirksamkeit von Flufenaminsäure wurde an Ratten mit renaler Hypertension geprüft, ein Einfluß ließ sich nicht nachweisen⁸⁾. Bei Ratten wirkte sich Flufenaminsäure auf die Diurese dosisabhängig im Sinne einer Hemmung durch Na- und K-Retention aus. Diese Hemmung war bei adrenaletomierten Ratten verstärkt⁹⁾.

Bei Hunden waren nach Gabe von Flufenaminsäure keine Veränderungen im Elektrolythaushalt zu beobachten, abgesehen von einer Erhöhung der K-Ausscheidung.¹⁰⁾

Antibradykinin-Effekt beim Meerschweinchen

Eine beim Meerschweinchen durch Bradykinin hervorgerufene Bronchokonstriktion ließ sich durch Flufenaminsäure aufheben. Hierbei war die Substanz 4mal wirksamer als Phenylbutazon und 2mal so wirksam wie Acetylsalicylsäure¹¹⁾.

Antianaphylaktischer Effekt

Bei einem mit Hühnerei sensibilisierten und mit einem Antihistaminicum vorbehandelten Meerschweinchen konnte durch Applikation von Flufenaminsäure vor Antigenzufuhr die nicht-histaminergische anaphylaktische Bronchokonstriktion unterdrückt werden¹²⁾.

Physiologische Untersuchungen über Resorption und Elimination

Mittels Fluorometrie wurde bei Ratten nach oraler Gabe von 100 mg/kg ein maximaler Plasmaspiegel von 88 µg/ml innerhalb einer Stunde festgestellt. 1/3 des Medikamentes lag in Form eines Glukuronsäureesters vor¹³⁾.

Die Nierenausscheidung von Flufenaminsäure erfolgte langsam, erst 40-70 Stunden nach Applikation wurden maximale Werte gefunden. Die Geschwindigkeit der Darmausscheidung entsprach

ungefähr der der Niere.

Untersuchungen von Gewebsproben ergaben, daß die Anreicherung von Flufenaminsäure in der Leber etwa der im Plasma entsprach. Hirn, Herz, Skelettmuskulatur, Lunge und Milz wiesen nur geringe Spuren des Medikamentes auf¹³⁾.

Untersuchungen der Gallenflüssigkeit bei Hunden und Affen nach Gabe von radioaktiver Flufenaminsäure zeigten dort eine Anreicherung von Flufenaminsäure, sichtbar durch hohe Radioaktivität der Galle¹⁴⁾.

Das Vorliegen eines entero-hepatischen Kreislaufs von Flufenaminsäure bei Hunden und Affen konnte als sicher angenommen werden, nachdem Gallenflüssigkeit, die radioaktive Flufenaminsäure enthielt, ins Duodenum injiziert worden war und sich danach eine Radioaktivität des Blutes und der Galle feststellen ließ. Zwischen den einzelnen Tierarten bestanden Unterschiede hinsichtlich der Ausscheidungs menge. Während Affen und Ratten nur 15% durch den Darm, die Hauptmenge jedoch durch die Niere ausgeschieden, betrug beim Hund die Ausscheidung durch die Niere nur 10%, die Hauptausscheidung erfolgte durch den Darm¹⁴⁾.

Toxikologie und Toleranz beim Tier

Die Toxizitätswerte für Flufenaminsäure wurden bei Ratten und Mäusen an Einzeldosen zwischen 125-1250 mg/kg oral oder intraperitoneal appliziert geprüft¹⁵⁾.

Die Toxizitätsgrenze lag bei Ratten wesentlich niedriger als bei Mäusen. Die akute LD₅₀ bei oraler Gabe betrug bei der Maus 780-850 mg/kg, bei der Ratte 290-600 mg/kg.

Toxische Symptome wie vorübergehende Depression, fehlende Koordination und/oder Prostration waren bei beiden Tierarten gleich. Zur Feststellung der Toleranzgrenze bei Dauermedikation wurde Flufenaminsäure 15 Wochen lang an Hunde, Affen und Ratten verfüttert¹⁵⁾.

Ratten vertrugen 21 mg/kg/die über 4 Wochen ohne toxische Erscheinungen, bei 42-47 mg/kg/die kam es zu minimalem Ödem der Nierenpapillen und bei mehr als 47 mg/kg/die zu Papillendegeneration. 252 mg/kg/die über 15 Wochen führten zu Dünndarmalterationen¹⁵⁾¹⁶⁾.

Dauermedikation von Flufenaminsäure bei Affen zeigte, daß bis

200 mg/kg/die keine toxischen Reaktionen eintraten, Erhöhung der Dosis auf 400 mg/kg/die führte zu einem Anstieg des Harnstoff-N im Blut¹⁵⁾.

Hunde vertrugen eine Dauerzufuhr von 2x50 mg/kg/die Flufenaminsäure über 2 Jahre ohne irgendwelche Schädigungen oder Veränderungen. Bei einer Dosis von 2x100 mg/kg/die kam es zu Magenschleimhautveränderungen und Nierenalteration¹³⁾¹⁸⁾.

Weiterhin wurden Versuche mit Flufenaminsäure an trächtigen Hündinnen und Ratten gemacht¹⁹⁾²⁰⁾. Wurden die Tiere während der ganzen Graviditätsdauer oder 2 Monate vor der Konzeption mit dem Präparat gefüttert, traten vermehrt Skelettanomalien, intrauterine Hämorrhagien während der verlängerten Geburt und eine Reduktion der 24 Stunden-Überlebensrate auf. Zahl und Grösse der Würfe blieben normal.

Pathologische Befunde

Pathologische Veränderungen beschränkten sich bei allen Tierarten auf Niere und Gastrointestinaltrakt¹⁵⁾.

Bei der Ratte waren die Nierenerscheinungen am ausgeprägtesten. Sie traten in Form von Degenerationen, Ödemen und Papillitis, bei hohen Dosen in Form einer Papillitis necroticans auf. Die Veränderungen des Marks führten sekundär zu Alterationen der Cortex mit Infiltration mononuclearer Zellen¹⁵⁾¹⁶⁾.

Auch an Hunden- und Affennieren kam es zu Tubulusdegeneration, Atrophie der Cortex, Papillenödem, Degenerationen und Infiltration mononuclearer Zellen. Eine Papillitis necroticans konnte jedoch nie beobachtet werden.

Am Verdauungstrakt traten bei Ratten in niedrigen Dosen umschriebene Schleimhautdegenerationen und Lymphknotenatrophie auf, bei höheren Dosen von 252 mg/kg/die und mehr über 15 Wochen kam es neben Atrophie der Schleimhaut zu Degenerationen und Ulcerationen im caudalen Teil des Dünndarms, manchmal Peritonitis und Perforation¹⁶⁾.

Bei Hunden und Affen waren die Erscheinungen am Verdauungstrakt gering. Es wurden Schleimhautatrophien und Degenerationen beobachtet.

Die schweren Störungen der Niere bei Ratten werden auf die physiologische Besonderheit der Rattenniere oder aber auf die

Art der Applikation von Flufenaminsäure zurückgeführt. Während bei Hunden und Affen die Substanz intermittierend verabreicht wurde, erfolgte die Zufuhr des Medikamentes bei Ratten langdauernd.

Weiterhin hat sich ergeben, daß Flufenaminsäure parenteral appliziert zu lokaler Gewebsschädigung führt, so daß von dieser Darreichungsform Abstand genommen werden mußte¹⁶⁾.

Klinische Untersuchungen

Klinische Untersuchungen über physiologische und toxikologische Effekte von Flufenaminsäure wurden an 78 gesunden Freiwilligen gemacht. Die Versuchspersonen erhielten 50-1400 mg über verschiedene Zeiträume bis zu 12 Wochen.

Sechs Versuchspersonen erhielten Einzeldosen von 500 mg. Zwei Stunden nach Applikation des Medikaments war ein maximaler Blutspiegel von $19\mu\text{g/ml}$ erreicht, nach 3 Stunden fiel er auf die Hälfte ab²¹⁾.

25% der verabreichten Menge des Präparates erschien innerhalb der ersten zwei Tage im Urin, ein Maximum der Flufenaminsäureausscheidung war 4-8 Stunden nach Applikation erreicht²¹⁾.

Im Stuhl wurden weniger als 5% des Medikamentes nachgewiesen.

13 Versuchspersonen erhielten 3mal täglich 100 oder 200 mg 13 Tage lang²²⁾. Bei der Tagesdosis von 300 mg war der maximale Blutspiegel von $3-4\mu\text{g/ml}$ nach 2 Stunden erreicht, der Minimalspiegel betrug $0,5\mu\text{g/ml}$ kurz vor der morgendlichen Dosis. Bei der Tagesdosis von 600 mg erreichte der Blutspiegel nach 2 Stunden einen Maximalwert von $6-8\mu\text{g/ml}$, einen Minimalwert vor Applikation der morgendlichen Dosis von $0,7-1,1\mu\text{g/ml}$. 20% der Gesamtdosis wurde von der Niere ausgeschieden. Das Maximum der Ausscheidungsmenge wurde am 3.-4. Tag nach Verabreichung beobachtet. In den Fäces konnten weniger als 5% nachgewiesen werden²²⁾. Im Urin konnten zwei Metaboliten der Substanz isoliert werden. Es handelte sich hierbei um das 5-Hydroxy- und 4-Hydroxy-Derivat der Flufenaminsäure. Beide lagen als Glukuronsäure-ester vor. Auch im Stuhl konnte 5-Hydroxy-Derivat nachgewiesen werden. Beiden kommt jedoch keine wesentliche pharma-

kodynamische Wirkung zu. Sie besitzen einen schwach antiinflammatorischen Effekt²³⁾.

An 30 Gesunden wurden im doppelten Blindversuch über 5 Wochen Flufenaminsäure erprobt und zwar in Dosen von 50-250 mg. Jede Woche wurde die Dosis um 50 mg gesteigert. Blutuntersuchungen, Leber- und Nierenfunktionsprüfungen erfolgten vor, während und nach der Behandlung mit Flufenaminsäure. Geringfügige Nebenwirkungen wie Schläfrigkeit und Kopfschmerzen zeigten sich bei niedrigen Dosen, verschwanden jedoch bei nachfolgender Dosiserhöhung. Die Laborwerte blieben unverändert. Leukozytenzylinder im Urin wiesen auch Versuchspersonen bei Placebobehandlung auf²⁴⁾.

30 gesunde Freiwillige erhielten im Doppel-Blindversuch 16 Wochen lang täglich 800-1400 mg Flufenaminsäure auf vier Einzeldosen verteilt. Die Probanden wurden hierbei in 6er Gruppen aufgeteilt²⁵⁾.

Blutbilduntersuchungen, Urinalysen und Leberfunktionsprüfungen wurden vor und während der Behandlung alle zwei Wochen angestellt.

6 Versuchspersonen beendeten die Versuchsreihe nicht, nur einer aus Gründen, die mit dem Medikament in Zusammenhang standen. Bei ihm kam es zu einem Anstieg der SGPT und des Harnstoff-N im Blut, weiterhin trat eine Leukopenie auf.

Bei den übrigen Probanden traten Nebenwirkungen hauptsächlich am Verdauungstrakt und an den Harnorganen auf. Diese äußerten sich als Brennen beim Wasserlassen, Durchfälle, Mißempfinden im Bauch und Magenschmerzen. Bei Steigerung der Dosis verstärkten sich diese Erscheinungen. In einem Fall kam es zu erhöhter SGOT und SGPT, in zwei Fällen zu Leukozytose, in sieben Fällen zu erhöhtem Harnstoff-N im Blut²⁴⁾.

Therapieversuche

Therapieversuche wurden bei Patienten gemacht, die folgende Bedingungen erfüllten:

Es lag entweder eine "klassische" oder "gesicherte" chronische Polyarthrititis vor, wie sie von der American Rheumatism Asso-

ciation definiert wurde. Die Krankheit bestand seit mehr als einem Jahr. Der Grad der Arthritis wurde nach dem Lansbury-System-Index eingeteilt. Dazu wurden Untersuchungen vor, während und nach der Behandlung mit Flufenaminsäure angestellt. Zu den wichtigsten Komponenten des LSI gehören

- a) die Dauer der morgendlichen Steifheit
- b) die Zahl der täglich eingenommenen Aspirintabletten
- c) die Griffstärke.

Zur Beurteilung des Schweregrades der Arthritis diene außerdem der Gelenkindex.

Bei den Therapieversuchen wurde als Schwellwert für eine sicher wirksame Dosis 250 mg/die ermittelt. Hierbei kam es nach einem Monat zu einer leichten Besserung. Ein weiterer Versuch wurde angestellt, um Flufenaminsäure und Aspirin miteinander zu vergleichen²⁷⁾.

Zwei Gruppen mit jeweils 8 Versuchspersonen erhielten im doppelten Blindversuch über 8 Wochen täglich 300 mg Flufenaminsäure und 1 500 mg Aspirin, nachdem eine zweiwöchige Placebo-behandlung vorausgegangen war.

Während mit Flufenaminsäure sechs Personen deutlich, eine Person teilweise gebessert werden konnten, wurde bei der Aspirin-versuchsreihe nur eine Person erfolgreich behandelt²⁷⁾.

Ein anderer Versuch wurde mit 800 mg Flufenaminsäure und 1800 mg Aspirin gemacht. Im doppelten Blindversuch mit cross over erhielten 2 Versuchsgruppen mit je fünf Personen nach vorangegangener zweiwöchiger Placebobehandlung über 16 Wochen Flufenaminsäure und Aspirin, wobei in den ersten acht Wochen Flufenaminsäure, in der zweiten Hälfte der Behandlungsdauer Aspirin und umgekehrt gegeben wurde. Bei beiden Versuchsgruppen wurden keine wesentlichen Unterschiede im Erfolg erzielt. Die Behandlung sprach bei beiden Gruppen jeweils in der zweiten Versuchshälfte besser an, eine "erfolgreiche" Behandlung wurde jedoch nicht erreicht²⁸⁾.

In zwei weiteren Versuchsreihen erhielten jeweils eine Person eine Tagesdosis von 600 mg Flufenaminsäure. In beiden Fällen traten nach zwei und vier Wochen Durchfälle auf, so daß der

Versuch abgebrochen werden mußte. Bei einem Probanden trat jedoch eine subjektive Besserung bezüglich der Steifheit und Gelenksbeschwerden ein, bei dem anderen konnte keine Veränderung des rheumatischen Krankheitszustandes erzielt werden.

Ein anderer Versuch wurde mit verschiedenen hohen Dosen Flufenaminsäure gemacht, wobei zuerst vier Wochen lang 300 mg/die und danach eine Woche lang 600 mg appliziert wurden. Der LSI änderte sich nicht signifikant. Von den 17 auswertbaren Versuchspersonen hatten sich bei zehn die Beschwerden um mehr als die Hälfte, bei drei fast vollständig gebessert, bei den übrigen waren die Beschwerden um weniger als die Hälfte oder gar nicht reduziert worden²⁹⁾.

Zur Untersuchung der aspirineinsparenden Wirkung von Flufenaminsäure wurden über 4-8 Wochen Tagesdosen von 600 mg der Substanz gegeben. Eine zweiwöchige Placebobehandlung ging voraus. Nach 3-wöchiger Behandlung konnte bereits die Aspirindosis um 50% herabgesetzt werden. System- oder Gelenkindex änderten sich nicht signifikant. Subjektive Besserung trat jedoch bei zwei Versuchspersonen (von zehn insgesamt) ein³⁰⁾.

Ein weiterer Versuch diente dazu, eine mögliche Einsparung der täglichen Prednisolondosis durch Flufenaminsäure festzustellen³¹⁾. Im doppelten Blindversuch wurden Patienten mit chronischer Polyarthrititis 800 mg Flufenaminsäure und 600 mg Phenylbutazon täglich verabfolgt. Der Versuch ging über sechs Wochen. Die Prednisoloneinsparung durch Flufenaminsäure betrug 2,36-5,41 mg/die, durch Phenylbutazon 1,25-2,68 mg/die.

Der LSI zeigte bei beiden Medikamenten keine Veränderung, während beim Gelenkindex unter Flufenaminsäure eine deutliche, unter Phenylbutazon eine geringe Besserung eintrat. Der klinische Index änderte sich bei beiden Pharmaka nur wenig. Nebenwirkungen traten bei Flufenaminsäure häufiger und schwerwiegender auf als bei Phenylbutazon. In sieben von 22 Fällen mußte der Versuch wegen Magenbeschwerden abgebrochen werden.

Die Laborwerte wichen nicht signifikant von den Normalwerten ab.

Wie sich später herausstellte, war die Tagesdosis von 800 mg

Flufenaminsäure bezüglich der Nebenwirkungsquote zu hoch. Bei einer Dosierung von 600 mg Flufenaminsäure pro Tag ist mit einer Verminderung der Nebenwirkungen, aber auch mit einer Reduktion des glukokortikoideinsparenden Effektes zu rechnen.

Nebenwirkungen

Bis zu 300 mg/die waren auftretende Nebenerscheinungen gering: Schwindelgefühl, Hautausschlag, Ödeme oder Übelkeit, Nervosität, Kopfschmerzen, Nasenbluten. Die Nebenwirkungen traten bei 18,5% der Probanden auf, die täglich 150-250 mg Flufenaminsäure über vier bis zwölf Wochen erhalten hatten³²⁻³⁴⁾²⁶⁾.

Bei einer Tagesdosis von 300 mg traten gastrointestinale Beschwerden auf²⁹⁾³⁵⁾.

Zu Durchfällen kam es bei Tagesdosen zwischen 400 und 600 mg/die. Verstärkte gastrointestinale Beschwerden erschienen bei Tagesdosen von 800 mg. Diese äußerten sich als Schmerzen im Abdomen, Uicussympptome, Auftreten von Ulcera und Durchfälle³⁶⁾.

Laborbefunde

Außerhalb der Norm liegende Laborwerte wurden am häufigsten bei Tagesdosen zwischen 300 und 600 mg gefunden²⁹⁾. Die Veränderungen betrafen hauptsächlich das Differentialblutbild. Hier wichen besonders die Werte der Lymphocyten, der eosinophilen Granulocyten und der Hämatokrit ab. Im Urin fanden sich Leukozyten und hyaline Zylinder. Bei Patienten mit Tagesdosen von 150 mg trat eine Albuminurie auf, die aber auch während der Placebobehandlung festgestellt werden konnte.

Abschließend kann jedoch gesagt werden, daß die beobachteten Veränderungen klinisch bedeutungslos waren.

Eigene Untersuchungen

Im folgenden soll die Frage geklärt werden, ob der Flufenaminsäure eine hyaluronidase-hemmende Wirkung zukommt. Diese ist neben dem antiphlogistischen, analgetischen, und antipyretischen Effekt des Präparates von Bedeutung, da im rheumatischen Gewebe vermehrt Hyaluronidase zu finden ist. Dieses Ferment ist auch Bestandteil des normalen Gewebes, wo es durch Depolymerisation und Hydrolyse die Hyaluronsäure abbaut, in seiner Funktion jedoch durch ein Antiferment beschränkt wird. Ein

Gleichgewicht zwischen diesen beiden Fermenten sichert den für das intakte Gewebe notwendigen Bestand an Hyaluronsäure. Diese Säure ist Baustein der Zwischensubstanz des Gewebes, speziell der Kapillaren³⁷⁾. Die bei Rheumatismus vermehrt auftretende Hyaluronidase führt zu einem vermehrten Abbau von Hyaluronsäure, in dessen Folge eine erhöhte Permeabilität der Kapillaren mit Ernährungsstörungen des umliegenden Gewebes und hypoxämische Schmerzen auftreten³⁸⁾.

Alle bisher in der Rheumabehandlung verwandten Medikamente besitzen einen hyaluronidasehemmenden Effekt, der wie zahlreiche Versuche ergeben haben, folgendermaßen zustande kommt: das Pharmakon bewirkt eine Ausschüttung von Katecholamin aus dem Nebennierenmark. Katecholamin wiederum führt zu einer Freisetzung von Histamin und Heparin aus den Mastzellen. Die beiden letztgenannten Substanzen schließlich hemmen die Aktivität der Hyaluronidase³⁹⁾.

Die hyaluronidasehemmende Wirkung der rheumatischen Medikamente läßt sich durch Entfernen des Nebennierenmarks⁴⁰⁾ oder aber Applikation von Ganglienblocker, bzw. Ergotamintartrat⁴¹⁾ oder Protaminsulfat verhindern⁴²⁾. Dabei wird der oben angeführte Mechanismus der Hyasehemmung an einer bestimmten Stelle unterbrochen.

Versuchsmethodik

Zur Prüfung einer etwaigen Hyaluronidasehemmung diente der Farbstoff-Hyaluronidase-Spreading-Test.

Versuchspersonen im Alter von 20-25 Jahren und einem durchschnittlichen Körpergewicht von 75 kg wurde dazu zwei verschiedene Lösungen injiziert.

Gesetzt wurde einmal eine Farbstoffquaddel=F, wobei 0,1 ml einer 1% Patentblau-VF-Lösung in physiologischer NaCl-Lösung injiziert wurde, zum andern eine Farbstoff-Hyaluronidase-quaddel=FH. Zur Herstellung einer Farbstoff-Hyaluronidase löste man 75 IE einer hochgereinigten Test-Hyaluronidase(=Kinetin) in 1 ml der oben genannten Farbstofflösung und injizierte 0,1 ml dieser Lösung. Zur Injektion wurden Tuberkulinspritzen mit 1er Kanülen verwandt.

Die Applikation der Lösungen geschah streng intracutan in die Bauchhaut der liegenden Probanden. Der Versuchsbereich lag etwa drei Finger breit von der Medianlinie entfernt beiderseits und unterhalb des Nabels.

Zehn Minuten nach Injektion der genannten Lösungen wurde die Größe der Quaddeln abgelesen. Nach dieser Zeit ist ein Maximum der Hyaluronidaseaktivität erreicht. Die äußerste sichtbare Farbstoffgrenze wurde mit Kugelschreiber umrandet und nach Auflegen einer durchsichtigen Kunststoffolie durch Einritzen auf diese übertragen. Mittels Planimetrie konnte dann die Größe der Quaddeln errechnet werden.

Versuchsreihe I

Bei drei Probanden wurden zunächst Leerquaddeln gesetzt, d.h. es wurden jeweils zwei Quaddelpaare der o. a. Zusammensetzung appliziert und das arithmetische Mittel aus den beiden Farbstoff- bzw. aus den beiden Farbstoff-Hyase-Werten ermittelt. Diese Werte dienten als Ausgangswert und Bezugsgröße für die später gesetzten Quaddeln. Danach erhielten die Versuchspersonen ein Placebo und 30 Minuten später wurde das erste Quaddelpaar appliziert, dem in Abständen von 15 Minuten acht weitere Quaddelpaare folgten. Das Ablesen der Quaddelgröße geschah jedesmal wie bereits oben erwähnt zehn Minuten nach Injektion der Lösung.

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse für jeden Probanden aufgezeichnet, beginnend mit den im Leerversuch ermittelten Quaddelwerten, dem Farbstoffwert=F und dem Farbstoff-Hyase-Wert= FH. Danach folgen die Werte nach Placebogabe. Von ihnen wurde jedesmal die Differenz zur Ausgangsquaddel berechnet. Außerdem sind die Zeitpunkte angegeben, zu denen die Quaddeln gesetzt wurden.

In Abb. I-IV ist die graphische Darstellung der Farbstoff- bzw. der Farbstoff-Hyase-Ausbreitung wiedergegeben. Die Kurven wurden mit Hilfe der in Tabelle 1 ermittelten Differenzwerte gezeichnet.

Versuchsreihe II

In der nächsten Versuchsreihe wurde bei sechs Probanden zu-

nächst wie oben verfahren, indem die Leerwerte für Farbstoff und Farbstoff-Hyaluronidase nach Setzen von Leerquaddeln für jede Versuchsperson ermittelt wurden. Dann nahmen die Probanden 100 mg Arlef in Form von Kapseln ein. Dreißig Minuten später wurde das erste Quaddelpaar gesetzt und der Zeitpunkt 30' in eine Tabelle eingetragen. Bis zum Zeitpunkt 165' folgte alle 15 Minuten jeweils ein weiteres Quaddelpaar, so daß also nach Applikation des Medikamentes zehn Quaddelpaare gesetzt wurden.

Die Tabellen 2 und 3 zeigen die in dieser Versuchsreihe gefundenen Werte. Zunächst wieder Einzeltabellen für jeden Probanden, dann die Tabelle der Durchschnittswerte aller sechs Probanden. Die Tabellen wurden nach dem gleichen Prinzip angelegt wie in Tabelle 1.

In den Abbildungen V-XIV befinden sich die zu den in Tabelle 2 und 3 gefundenen Durchschnittswerten (Df u. Dfh) gehörigen Kurven, für jeden Probanden eine Kurve der Farbstoff-Hyase-Ausbreitung (Abb. V-IX) und eine der Farbstoffausbreitung (Abb. XI-XIII), sowie die Kurven der Durchschnittswerte aller sechs Probanden (Abb. X und XIV).

Zeichenerklärung der Tabellen 1-3:

Leer:= Leerquaddel (Leerversuch vor Applikation von Placebo bzw. Arlef 100)

FH=Farbstoff-Hyase-Quaddel F=Farbstoffquaddel

Df=Differenz zwischen Farbstoffleerquaddel und Farbstoffquaddel nach Applikation von Placebo bzw. Arlef 100

Dfh=Differenz zwischen Leerquaddel Farbstoff-Hyase und Quaddel Farbstoff-Hyase nach Applikation von Placebo bzw. Arlef 100

Tabelle 1

Ergebnisse der Versuchsreihe I mit Placebo

Einzelaufzeichnung für jeden Probanden über Größe der Farbstoff- und Farbstoff-Hyase-Quaddel nach Placebogabe, sowie deren Differenz zur Ausgangsquaddel.

Versuchsperson	I			
Zeit	F	FH	Df	Dfh
Leer	46	60		
30'	40	56	-6	-4
45'	46	59	0	-1
60'	41	62	-5	+2
75'	39	61	-7	+1
90'	44	62	-2	+2
105'	38	58	-8	-2
120'	41	55	-5	-5
135'	39	53	-7	-7
150'	41	52	-5	-8

Versuchsperson	II			
F	FH	Df	Dfh	
40	62			
47	65	+7	+3	
42	60	+2	-2	
42	60	+32	-2	
46	64	+6	+2	
44	60	+4	-2	
43	62	+3	0	
48	58	+8	-4	
38	60	-2	-2	
37	55	-3	-7	

Versuchsperson	III			
Zeit	F	FH	Df	Dfh
Leer	46	62		
30'	44	58	-2	-4
45'	44	60	-2	-2
60'	47	60	+1	-2
75'	48	62	+2	0
90'	41	62	-5	0
105'	41	56	-5	-6
120'	39	54	-7	-8
135'	38	54	-8	-8
150'	46	64	0	+2

Durchschnittswerte			
F	FH	Df	Dfh
44	61,3		
43,6	59,6	-0,4	-1,7
44	59,6	0	-1,7
43,3	60,6	-0,7	-0,7
44,3	62,3	+0,3	+1,0
43	61,3	-1,0	0
40,6	58,6	-3,4	-2,7
42,6	55,6	-1,4	-5,7
38,3	55,6	-5,7	-5,7
41,3	57,0	-2,7	-4,3

Tabelle 2

Versuchsreihe II nach oraler Gabe von Arlef 100
 Einzelaufzeichnung für jeden Probanden nach Gabe von Arlef 100
 über Ausdehnung der Farbstoff- bzw. Farbstoff-Hyase-Quaddel,
 sowie deren Differenz zur Ausgangsquaddel.

Versuchsperson I					Versuchsperson II			
Zeit	F	FH	Df	Dfh	F	FH	Df	Dfh
Leer	43	78			44	64		
30'	50	63	+7	-15	44	62	0	- 2
45'	50	68	+7	-10	46	58	+2	-6
60'	44	56	+1	-22	36	50	-8	-14
75'	42	56	-1	-22	40	42	-4	-22
90'	38	64	-5	-14	44	52	0	-12
105'	48	70	+5	- 8	45	42	+1	-22
120'	46	64	+3	-14	44	42	0	-22
135'	46	86	+3	+ 8	44	58	0	- 6
150'	46	84	+3	+ 6	40	56	-4	- 8
165'	50	70	+7	- 8	44	54	0	-10

Versuchsperson III					Versuchsperson IV			
Zeit	F	FH	Df	Dfh	F	FH	Df	Dfh
Leer	49	72			42	62		
30'	48	72	-1	0	42	56	0	-6
45'	42	40	-7	-32	40	58	-2	- 4
60'	50	46	+1	-26	42	46	0	-16
75'	46	52	-3	-20	44	44	+2	-18
90'	40	54	-9	-18	40	30	-2	-32
105'	46	60	-3	-12	42	38	0	-24
120'	48	70	-1	- 2	38	42	-4	-20
135'	34	50	-15	-22	50	58	+8	- 4
150'	50	62	+1	-10	48	66	+6	+ 4
165'	50	70	+1	- 2	44	62	+2	0

Tabelle 3

Versuchsreihe II nach oraler Gabe von Arlef 100

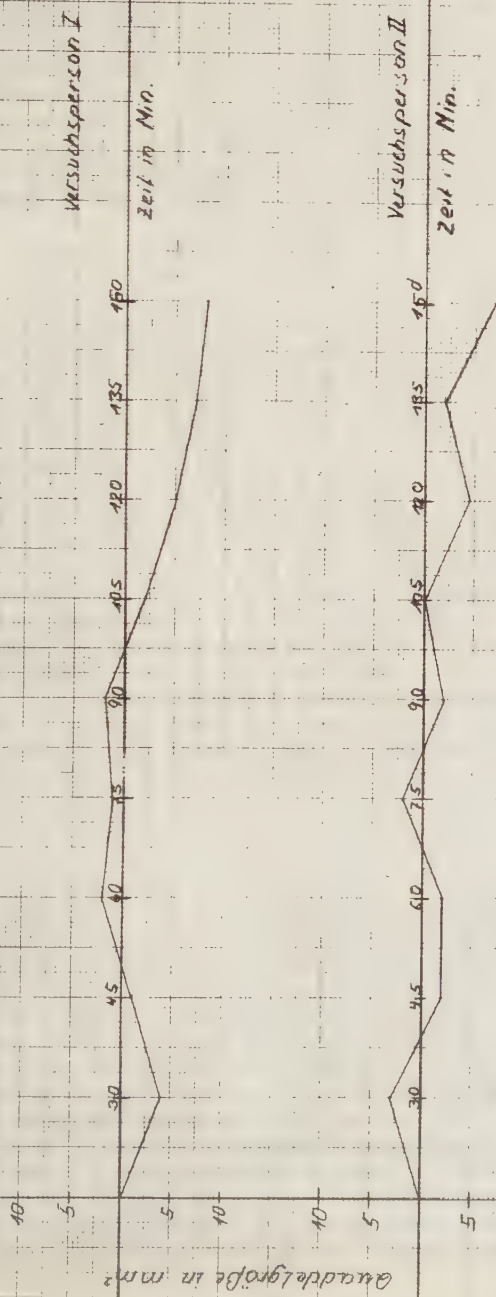
Einzelzeichnung für jeden Probanden über Ausdehnung der Farbstoff- bzw. Farbstoff-Hyase-Quaddel, sowie deren Differenz zur Ausgangsquaddel.

Versuchsperson V			Versuchsperson VI					
Zeit	F	FH	Df	Dfh	F	FH	Df	Dfh
Leer	40	61			42	62		
30'	42	60	+2	-1	46	62	+4	0
45'	40	66	0	+5	42	40	0	-22
60'	38	48	-2	-13	46	42	+4	-20
75'	44	42	+4	-19	48	50	+6	-12
90'	48	55	+8	-6	40	40	-2	-22
105'	48	52	+8	-9	48	40	+6	-22
120'	44	50	+4	-11	48	50	+6	-12
135'	42	64	+2	+3	46	54	+4	-8
150'	42	56	+2	-5	40	52	-2	-10
165'	40	62	-2	+1	40	62	-2	0

Durchschnittswerte der Versuchsreihe II

Zeit	F	FH	Df	Dfh
Leer	43,3	66,5		
30'	45,3	62,5	+2	-4
45'	43,3	55,0	0	-11,5
60'	42,6	48,0	-0,6	-18,5
75'	44,0	47,6	+0,6	-18,8
90'	41,6	49,1	-1,6	-17,3
105'	46,1	50,3	-2,83	-16,16
120'	44,6	53,0	+1,3	-13,5
135'	43,6	61,6	-0,3	-4,83
150'	44,3	62,6	+1	-3,83
165'	44,46	63,3	+1,16	-3,16

Abb. I



Versuchsreihe I mit Placebo.
 Verlauf der Farbstoff-Hyase Werte nach Placebogabe.
 Einzelkurve für jeden Probanden.

Abb II

Versuchsreihe III

Zeit in Min

Versuchsreihe I mit Placebo.
Verlauf der Farbstoff-Hyase-Werte nach Placebogabe.
Einzelkurve für jeden Probanden.

Zeit in Min

Versuchsreihe I mit Placebo.
Verlauf der Durchschnittswerte (arithmetisches Mittel)
der Farbstoff-Hyase-Werte für alle drei Probanden.

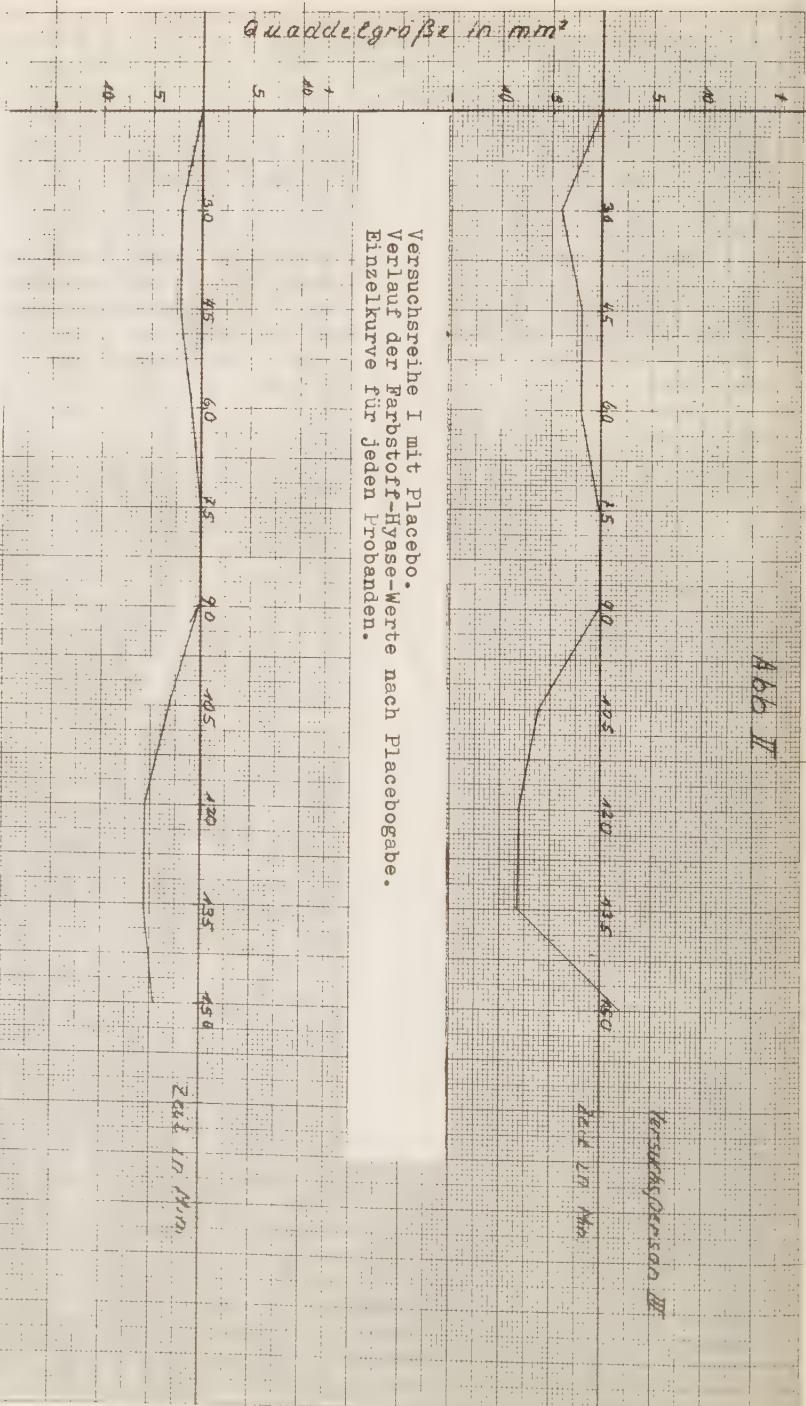


Abb. III

Versuchsperson A

Zeit in Min.

90 75 60 45 30 15 0 15 30 45 60 75 90 105 120 135 150



Versuchsperson B

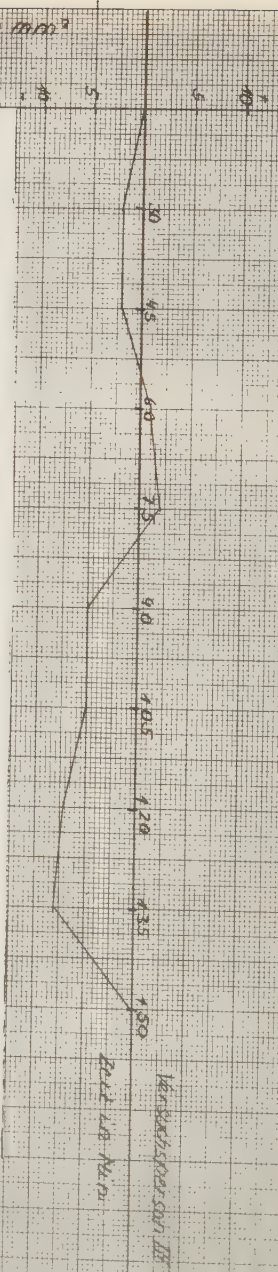
Zeit in Min.

30 45 60 75 90 105 120 135 150

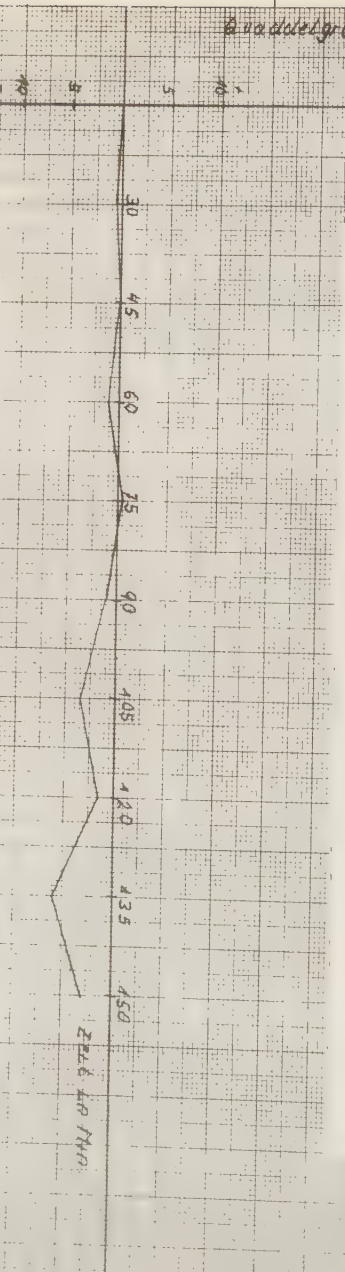


Versuchsreihe I mit Placebo.
Verlauf der Farbstoff-Werte nach Placebogabe.
Einzelkurve für jeden Probanden.

Abb. IV



Versuchsreihe I mit Placebo.
Verlauf der Farbstoff-Werte nach Placebogabe.
Einzelkurve für jeden Probanden.



Versuchsreihe I mit Placebo.
Verlauf der Durchschnittswerte (arithmetisches Mittel)
der Farbstoffwerte für alle 5 Probanden.

Abb. I

Versuchsreihe II

Zeit in Min.

30 45 60 75 90 105 120 135 150 165

Farbstoffgehalt in mm

30 45 60 75 90 105 120 135 150 165

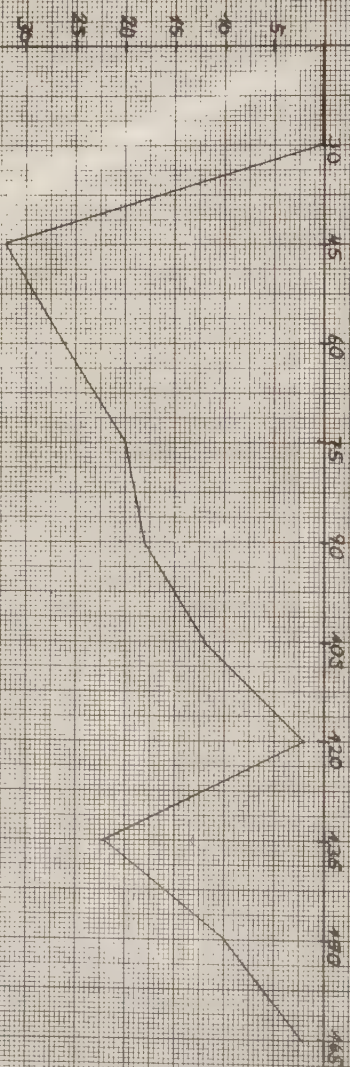
Zeit in Min.

30 45 60 75 90 105 120 135 150 165

Versuchsreihe II mit Arlef 100.
Verlauf der Farbstoff-Hyase-Werte nach Gabe von Arlef 100.
Einzelkurve für jeden Probanden.

Abb. II

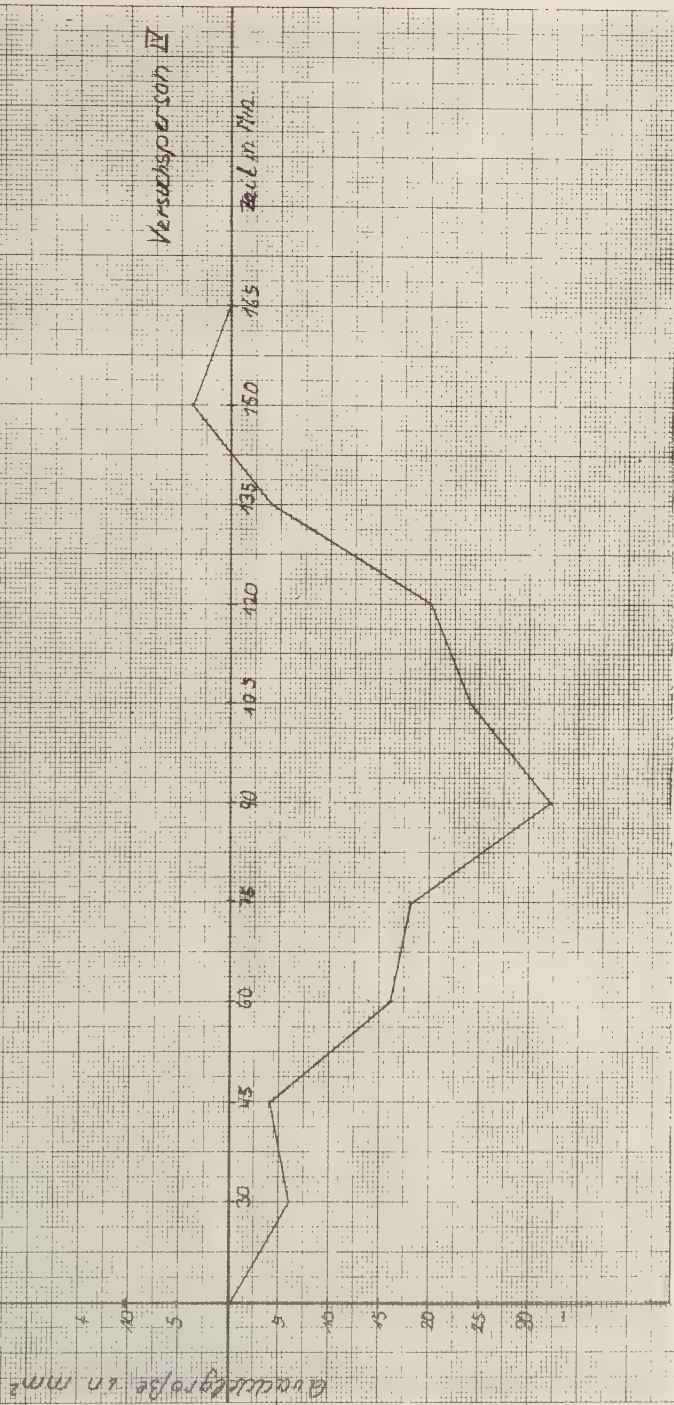
Quadratgröße in mm²



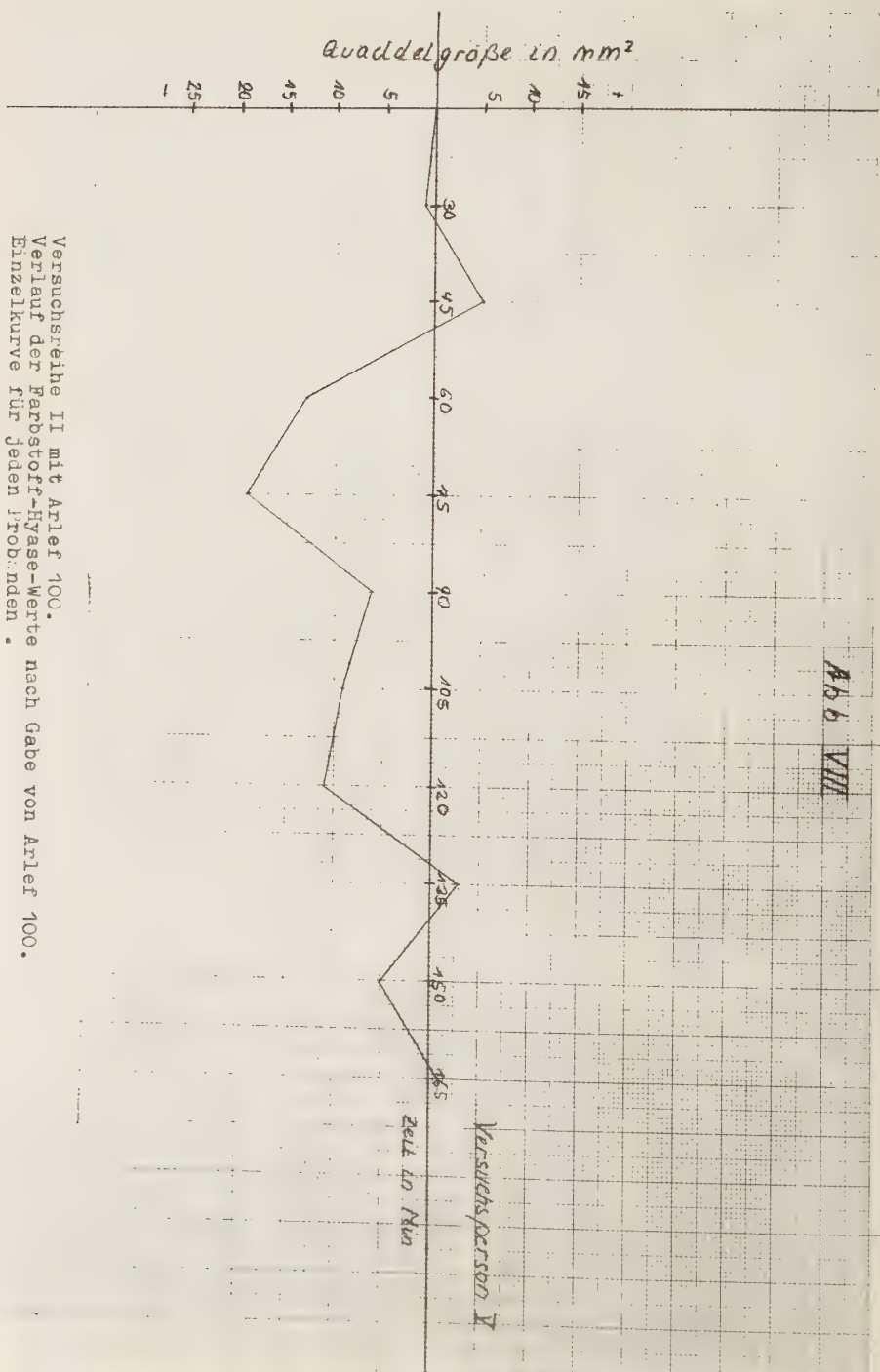
Versuchsreihe III
Zeit in Min.

Versuchsreihe II mit Arlef 100.
Verlauf der Farbstoff-Hyase-Werte nach Gabe von Arlef 100.
Einzelkurve für jeden Probanden.

Abb. VII



Versuchsreihe II mit Arlef 100.
Verlauf der Farbstoff-Hyase-Werte nach Gabe von Arlef 100.
Einzelkurve für jeden Probanden.



Versuchsreihe II mit Arlef 100.
Verlauf der Farbstoff-Hyase-Werte nach Gabe von Arlef 100.
Einzelkurve für jeden Probanden.

Abb IX

Quaddelgröße in mm²

7 10 5 5 10 15 20 25 30

Versuchsreihe VI

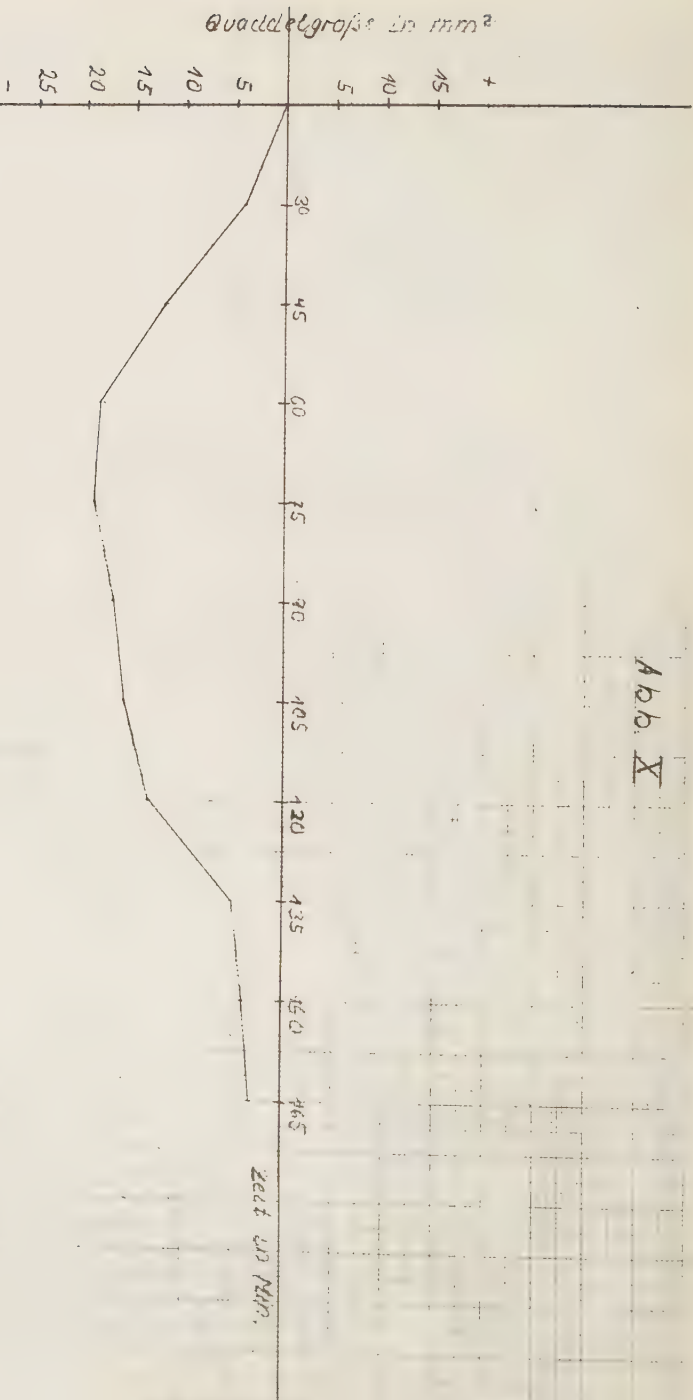
Zellen/Mm²

30 45 60 75 90 105 120 135 150 165



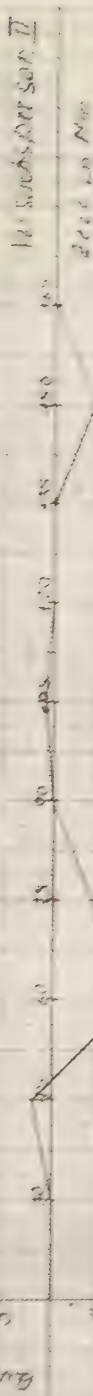
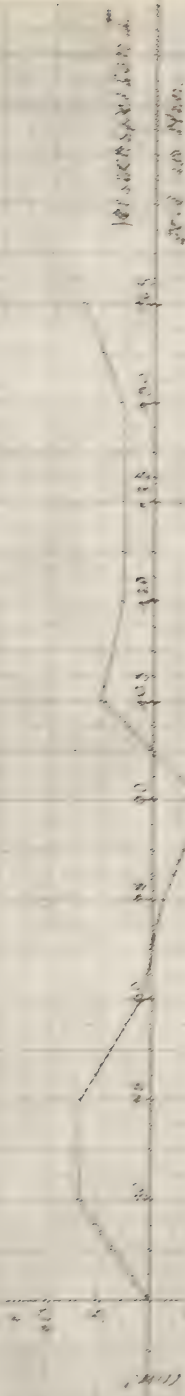
Versuchsreihe II mit Arlef 100.
Verlauf der Farbstoff-Hyase-Werte nach Gabe von Arlef 100.
Einzelkurve für jeden Probanden.

Abb. X



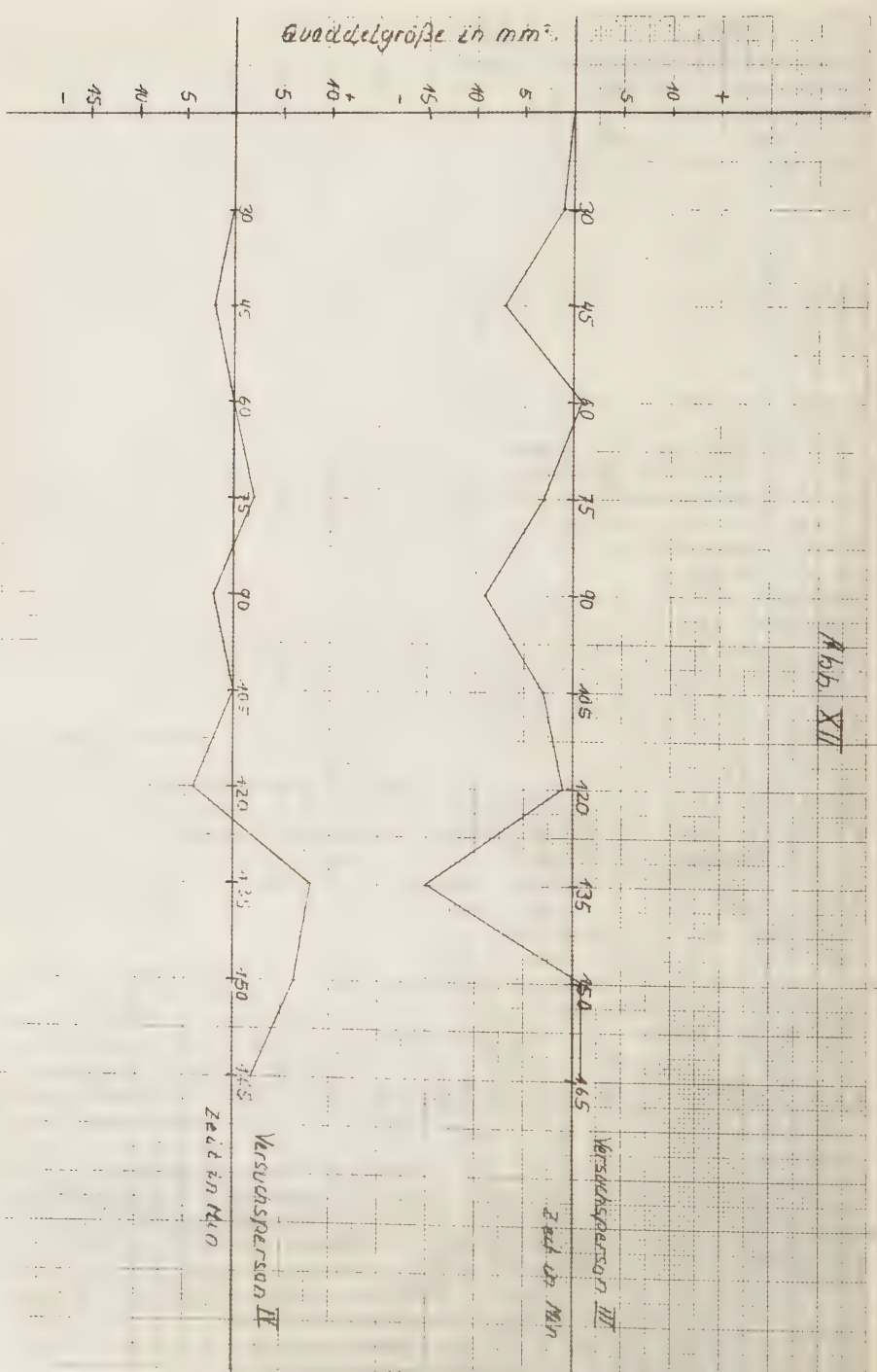
Versuchsreihe II mit Arlef 100.
Verlauf der Durchschnittswerte (arithmetisches Mittel) der
Farbstoffkonzentration nach Gabe von Arlef 100.

100. XI



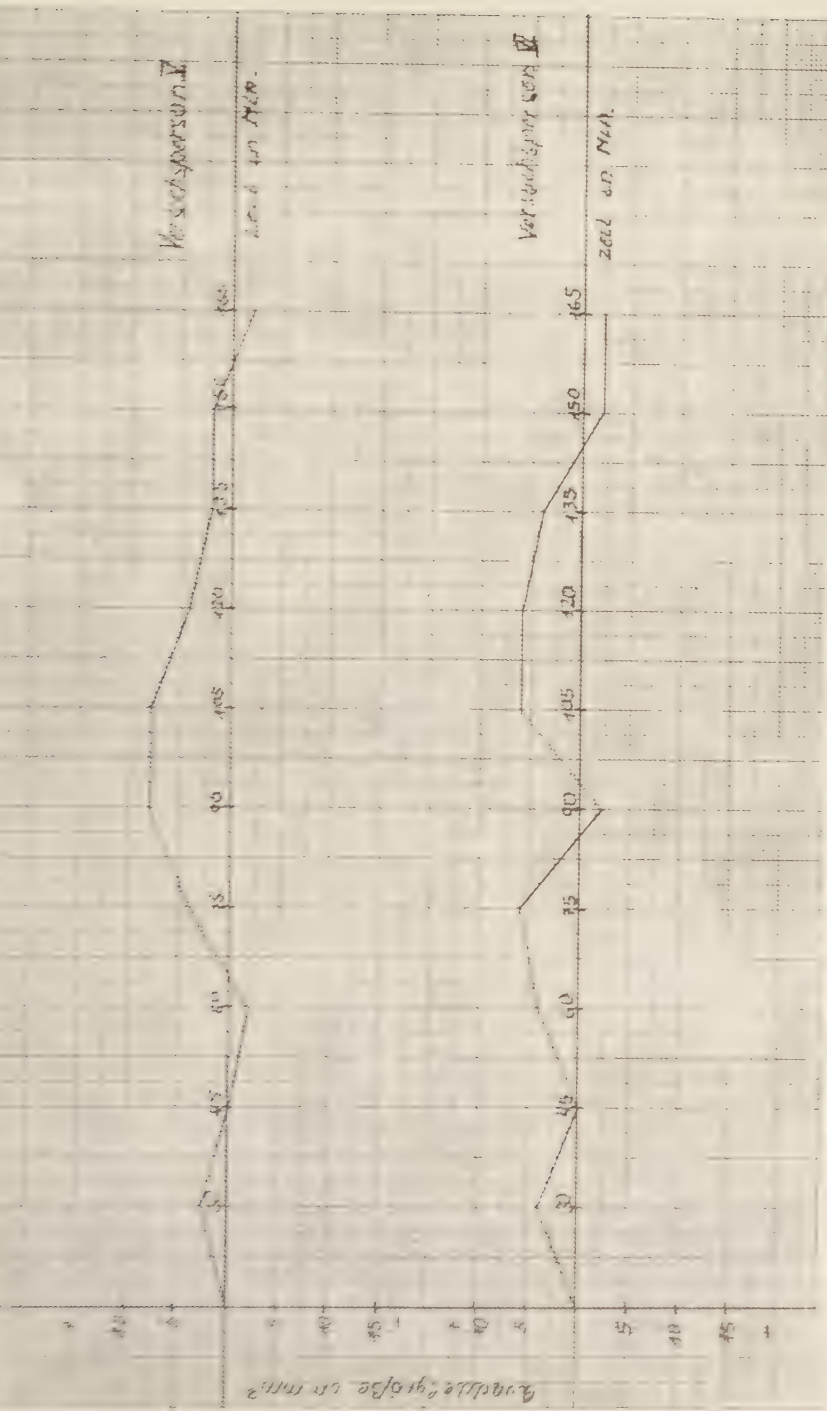
Versuchsreihe II mit Arlef 100.
Verlauf der Farbstoffwerte nach Gabe von Arlef 100.
Einzelkurve für jeden Probanden.

Abb. XII



Versuchsreihe II mit Arlef 100.
 Verlauf der Farbstoffwerte nach Gabe von Arlef 100.
 Einzelkurve für jeden Irobanden.

Abb. VIII



Versuchsreihe II mit Arlef 100.
Verlauf der Farbstoffwerte nach Gabe von Arlef 100.
Einzelkurve für jeden Probanden.

Abb XIV

Quaddi Größe 20 mm

1
5
10
5
10



Zeit 20 Min.

Versuchsreihe II mit Arlef 100.
Verlauf der Durchschnittswerte (arithmetisches Mittel) der
Farbstoffwerte nach Gabe von Arlef 100 für alle 6 Probanden.

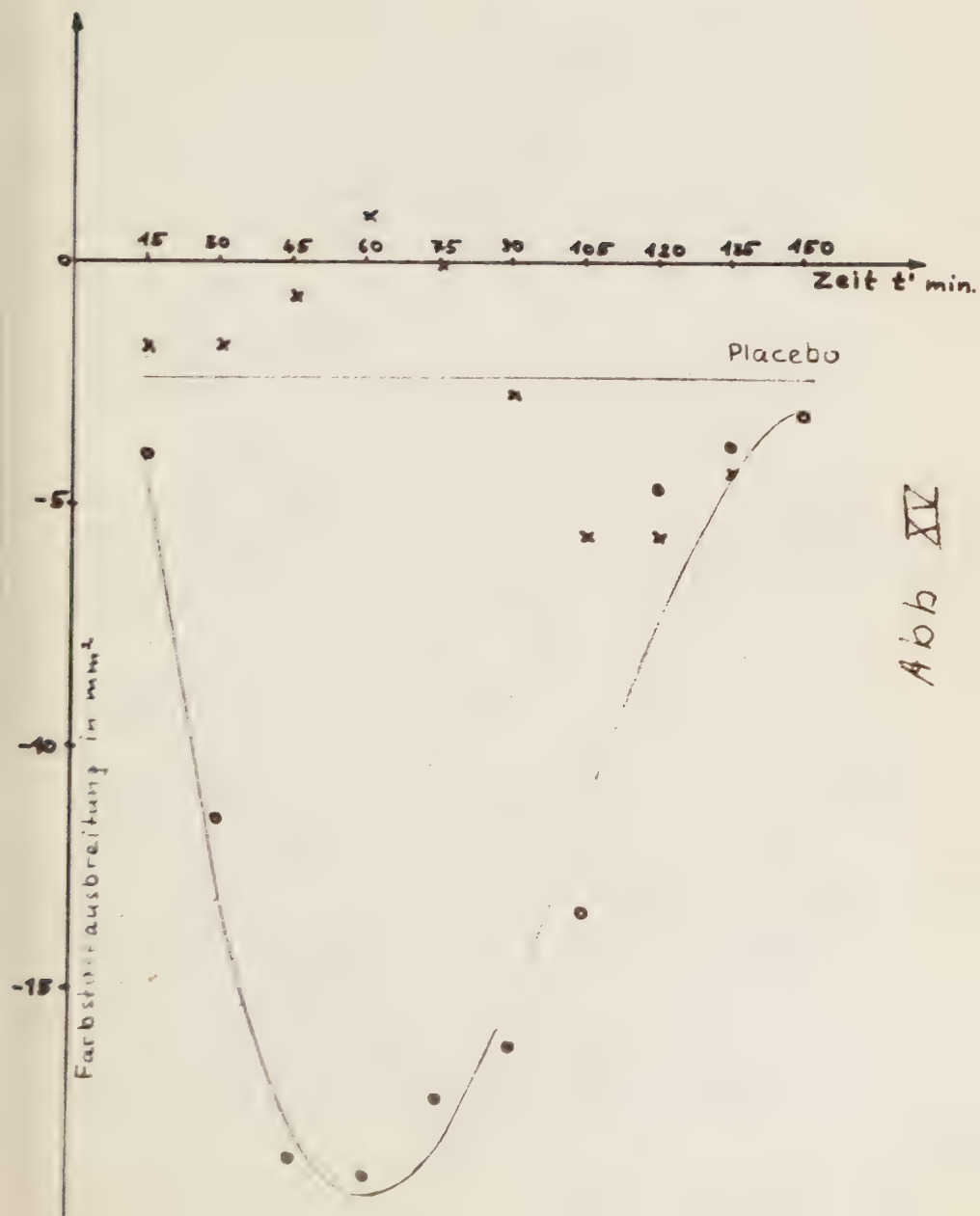


Abb. IV

Ergebnisse der Untersuchung

Die Durchschnittswerte (arithmetisches Mittel) der Farbstoff- und Farbstoff-Hyaluronidase-Reaktionen für die 3 Versuchspersonen der Placebo-Gruppe und die 6 Versuchspersonen der Arlef-Gruppe findet man in Tabelle 1 und 3.

Die ersten beiden Spalten enthalten die Absolut-Werte, die nächsten die Differenzen gegenüber dem Ausgangswert. Die Abhängigkeit der Reaktion von der Zeit und von der Behandlung (Placebo bzw. Arlef) soll mit Hilfe einer Regressions-Berechnung untersucht werden.

Regressions-Verfahren

Das Regressionsmodell für den u-ten Wert des Datensatzes lautet:

$$y_u = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_k X_k + \varepsilon_u,$$

wobei y die zu erklärende "abhängige" Variable, in diesem Fall die Reaktion, ist und X_1 bis X_2 die erklärenden "unabhängigen" Variablen, hier also die Zeit und die Behandlung, bedeuten. Die Größe ε_u ist der unbekannte Störeinfluß des u-ten Wertes von y und hat den Mittelwert 0 und die Varianz σ^2 .

Die Aufgabe der Regressionsrechnung ist es, eine Schätzung der unbekannten Regressionskoeffizienten

$$\beta_0, \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_k \quad \text{zu liefern.}$$

Hierzu wird der Ansatz gemacht

$$\hat{y} = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + \dots + b_k X_k,$$

wobei $b_0, b_1, b_2, \dots, b_k$ die gewünschten Schätzungen für die entsprechenden Regressionskoeffizienten sind. Die Schätzungen erhält man aus der Forderung, daß die quadratische Abweichung von y und $\hat{y}$ minimal wird.

Die hieraus ermittelten Werte $b_1, b_2, \dots, b_k$ sind Maßzahlen für die Zusammenhänge zwischen der Variablen y und den entsprechenden X-Variablen. Für die Praxis sind nur Wirkungen b_i , $i = 1, 2, \dots, k$, interessant, die sich nicht nur zufällig von Null un-

terscheiden. Die Wirkung wird dann als signifikant beurteilt, wenn sie sich von der aus dem gleichen Datensatz ermittelten zufälligen Schwankung deutlich abhebt.

Das Bestimmtheitsmaß (Determinationskoeffizient) gibt den Anteil der Schwankungen von y an, der sich auf die Wirkung der ermittelten signifikanten Variablen zurückführen läßt. Das Maß drückt in Prozenten aus, wie weit sich die gefundene Ordnung vom Zufall abhebt.

Das Regressionsmodell bietet die Möglichkeit, durch Kombination von Variablen neue Variable zu erzeugen und damit mögliche Wechselwirkungen zu erfassen.

Die Daten der Placebo- und Versuchsgruppe wurden herangezogen, um ein Regressionsmodell zu entwickeln, bei dem die Behandlung (Placebo und Arlef) durch eine 0/1-Variable (Placebo = 0, Arlef = 1) repräsentiert ist und der zeitliche Verlauf der Reaktion durch die Zeitvariable (Potenzglieder bis zur 4. Ordnung) dargestellt ist. Außerdem wurden die Produkte der Zeitglieder mit der Drogenvariable mit einbezogen (z.B. bxt^2xD). Mit Hilfe der im Rechengang ermittelten signifikanten b-Koeffizienten ist es möglich:

1. den zeitlichen Verlauf der Reaktion y zu beschreiben,
2. die beiden Behandlungsarten zu differenzieren, sofern es die Datenlage erlaubt.

Die Berechnung lieferte folgendes Ergebnis:

Die Verrechnung der Farbstoff-Werte, ob von Absolut-Werten oder von Differenzen ausgehend, lieferte keine signifikante Reaktion, d.h. die Änderung der Meßwerte ist nicht wesentlich größer, als man es dem Zufall nach erwarten dürfte.

Die Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel dagegen zeigt eine deutliche Reaktion. Die Verarbeitung der Absolut-Werte ergibt eine Gleichung mit einer Bestimmtheit von 30,75%, d.h. 30,75% der Variation der Quaddel ist mit den einbezogenen Variablen assoziiert.

Ein wesentlich höheres Bestimmtheitsmaß erzielt die Verrechnung

der Differenz der Quaddel (51,49%). Man erhält dabei eine Reihe von signifikanten Koeffizienten, die für die Differenzen der Arlef-Werte eine kubische Parabel als beste Näherung an die Meßwerte erscheinen lassen.

Die ermittelte optimale Gleichung lautet:

$$y = - 2,37 + 13,54 D - 17,43 Dt + 3,02 Dt^2 - 0,142 Dt^3$$

Dabei ist $D = 0$ für Placebo und $D = 1$ für Arlef.

y ist die auf den Ausgangswert bezogene Änderung der Hyaluronidasehemmung, gemessen in mm^2 der Farbstoffausbreitung. t ist die Zeit, $t = 1$ bedeutet 15 min.

Für Arlef ($D = 1$) erhält man die in Abb. XV gezeichnete kubische Parabel. Ebenfalls eingezeichnet sind die arithmetischen Mittel der Werte, die zu den einzelnen Versuchszeiten bei den sechs Probanden gemessen worden sind. Offensichtlich paßt sich das Polynom dritter Ordnung diesen arithmetischen Mitteln gut an. Das Minimum des Polynoms dient als Maß für die größte erreichte Hemmung $H_{\max}$, der zugehörige Zeitpunkt $t_{\max}$ gibt an, wieviel Minuten nach Behandlung die stärkste Hemmung erzielt wurde. Man erhält

$$H_{\max} = 19,32 \text{ mm}^2 \text{ und } t_{\max} = 60,5 \text{ min,}$$

die Hemmung durch Arlef ist also nach 1 Stunde am größten. Dann geht die Hemmung wieder zurück.

Für Placebo ($D=0$) erhält man die in Abb. XV gezeichnete Konstante $- 2,37 \text{ mm}^2$. Ebenfalls eingezeichnet sind die arithmetischen Mittel der Werte, welche zu den einzelnen Versuchszeiten bei den 3 Probanden gemessen worden sind. Da 3 Personen mit Placebo, aber 6 Personen mit Arlef behandelt wurden, ist die Streuung der Placebo-Mittelwerte zwangsläufig größer als die Streuung der Arlef-Mittelwerte. Man sieht jedoch, daß durch Placebo keine systematische Beeinflussung der Hemmung erfolgt, während bei Arlef ein Trend deutlich zu erkennen ist.

Zusammenfassung und Diskussion

Die vielfältigen Wirkungen der Flufenaminsäure konnten in zahlreichen Versuchen vorklinischer und klinischer Art gezeigt und die Größe des Effekts mit der anderer antirheumatischer Substanzen verglichen werden. So wurde beim Meerschweinchen ein durch UV-Strahlen künstlich erzeugtes Erythem mit Flufenaminsäure unterdrückt¹⁾, bei Ratten das Wachstum eines Fremdkörpergranuloms gehemmt²⁾, und in anderen Versuchen konnte mit Flufenaminsäure künstlich erzeugtes Fieber gesenkt werden²⁾. Die entzündungshemmende Wirkung der Substanz konnte bei Ratten in verschiedenen Arthritismodellen nachgewiesen werden³⁾⁴⁾⁵⁾. Hier wurde durch Flufenaminsäure der Krankheitsverlauf gemildert. Einflüsse des Medikaments auf Herz und Kreislauf ließen sich nicht feststellen, bei Ratten hemmte Flufenaminsäure die Diurese durch Na- und K-Retention²⁾. Beim Meerschweinchen wurde weiterhin ein Antibradykinin-¹¹⁾ und ein antianaphylaktischer Effekt¹²⁾ beobachtet.

Physiologische Untersuchungen an Tieren bezüglich der Ausscheidungsart und -menge ergaben, daß Ratten und Affen die Hauptmenge der Substanz durch die Niere, nur 15% durch den Darm ausscheiden, während beim Hund 10% durch die Niere und der Hauptanteil durch den Darm eliminiert wurden¹⁴⁾. Die Anreicherung der Flufenaminsäure im Körper erfolgt hauptsächlich im Plasma und in der Leber, im Plasma lag ein Drittel der Substanz in Form eines Glukuronsäureesters vor¹³⁾. Auch in der Galle konnte Flufenaminsäure nachgewiesen und das Vorliegen eines entero-hepatischen Kreislaufs bei Hunden und Affen durch radioaktive Markierung der Substanz gezeigt werden¹⁴⁾. Die akute LD₅₀ oral appliziert, - von parenteraler Applikation mußte wegen lokaler Gewebsschädigung abgesehen werden - beträgt bei Ratten 290-650 mg/kg/die¹⁵⁾, bei Mäusen 780-850 mg/kg/die¹⁵⁾. Toxizitätserscheinungen traten bei beiden Tierarten in Form von vorübergehender Depression, fehlender Koordination und/oder Prostration auf¹⁵⁾. Die Toleranzgrenze bei Dauermedikation betrug bei Ratten 21 mg/kg/die, höhere Dosen verursachten Ödeme der Nierenpapillen (42 mg-47 mg/kg/die), Papillendegeneration (47 mg/kg/die) und Dünndarmalterationen (252 mg/kg/die)¹⁵⁾¹⁶⁾. Bei Affen lag im Dauerversuch die Toleranzgrenze bei 200 mg/kg/die, höhere Dosen (400 mg/kg/die)

führten zu einem Anstieg des Harnstoff-N im Blut¹⁵⁾. Hunde vertrugen 2x50 mg/kg/die über längere Zeit ohne toxische Erscheinungen, höhere Dosen von 2x100 mg/kg/die verursachten Nierenalterationen und Magenschleimhautveränderungen¹⁷⁾¹⁸⁾.

Bei gesunden Probanden wurde Flufenaminsäure hinsichtlich ihrer Verträglichkeit untersucht. Ohne Nebenwirkungen konnten 50-250 mg/die verabreicht werden²⁴⁾. Tägliche Dosen von 800-1400 mg über 16 Wochen bewirkten Erscheinungen am Verdauungstrakt, wie Durchfälle, Mißempfinden im Bauch und Magenschmerzen, außerdem Symptome an den Harnorganen in Form von Brennen beim Wasserlassen. Laboruntersuchungen ergaben erhöhte Werte der SGOT und SGPT, des Harnstoff-N im Blut, sowie Leukozytose²⁵⁾. Vergleichende Versuche über die Wirksamkeit von 300 mg/die Flufenaminsäure und 1800 mg/die Aspirin ergaben eine größere Wirksamkeit der Flufenaminsäure²⁷⁾, während bei Versuchen zum Vergleich von 800 mg/die Flufenaminsäure und 1800 mg/die Aspirin keine Unterschiede im Erfolg zu beobachten waren²⁸⁾. Weiterhin wurde die aspirineinsparende Wirkung der Flufenaminsäure untersucht, wobei eine Senkung der Aspirindosis um 50% erzielt werden konnte³⁰⁾. Auch die Prednisolondosis konnte bei gleichzeitiger Gabe von Flufenaminsäure (800 mg/die) um 2,36-5,4 mg/die reduziert werden³¹⁾. Nebenwirkungen bei den Therapieversuchen traten bei Dosen bis zu 300 mg/die in Form von Schwindelgefühl, Hautausschlag, Ödemen, Übelkeit, Nervosität, Kopfschmerzen und gastrointestinale Beschwerden auf³²⁻³⁴⁾²⁶⁾, wurde die Dosis auf 600 mg/die erhöht, so verstärkten sich die gastrointestinalen Symptome und wurden als Schmerzen im Abdomen, Ulcussymptome, Ulcera und Durchfälle diagnostiziert³⁶⁾. Abweichende Laborbefunde waren klinisch bedeutungslos²⁹⁾.

Die Aufgabe dieser Arbeit bestand darin festzustellen, ob der Flufenaminsäure ein hyaluronidase-hemmender Effekt zukommt. Dazu wurden mit Hilfe eines Farbstoff-Hyaluronidase-Spreading-Tests zwei Versuchsreihen angesetzt, in denen zuerst nach Applikation von Placebo und dann von Flufenaminsäure die Hyaluronidasehemmung untersucht wurde. In der Versuchsreihe mit Placebo trat keine signifikante Reaktion auf. Die Farbstoff-Hyaluronidase-Werte änderten sich zwar, lagen aber nicht außer-

halb des Zufallsbereichs. Außerdem war wegen der geringen Zahl der Probanden die Streuung der Werte größer, als dies bei einer größeren Anzahl Versuchspersonen zu erwarten gewesen wäre. Die statistische Auswertung dieser Versuchsreihe ergab für die Farbstoffausbreitung eine Konstante von $-2,37 \text{ mm}^2$. In der Versuchsreihe mit Flufenaminsäure trat bei allen sechs Probanden eine Hyaluronidasehemmung auf. Die Ausbreitung der Farbstoff-Hyase-Quaddeln wurde zwischen 45 und 120 min. nach Applikation des Medikaments am stärksten gehemmt, die größte Hemmung betrug 19-32 mm^2 : Die Einzelkurven der Farbstoff-Hyase-Werte für jeden Probanden zeigen diese Ergebnisse sehr anschaulich. Die statistische Auswertung ermittelte, daß die stärkste Hemmung nach 60,5 min. eintrat und 19,32 mm^2 betrug. Die reinen Farbstoffwerte änderten sich nicht im Sinne einer Hemmung. Die Meßwerte lagen im Bereich der Norm. Bei den Farbstoffquaddeln ohne Hyaluronidasebeigabe war naturgemäß keine Hemmung der Farbstoffausbreitung zu erwarten. Die Flufenaminsäure ist damit als hyaluronidase-hemmende Substanz anzuerkennen.

Literaturverzeichnis

- 1) Winder, C.V. et al. A study of pharmacological influences on ultraviolet erythema in guinea pigs. Arch. int. Pharmacodyn. 116:261 (1958)
- 2) Winder, C.V. et al. Antiinflammatory and antipyretic Properties of N-(α - α - α -Trifluoro-m tolyl) anthralic acid (CL-440), flufenamic acid) Arthritis and Rheum. 6:36. 1963
- 3) Glenn, E.M.: Adjuvant-induced arthritis: effects of certain drugs on incidence, clinical severity and biochemical changes. Am.J.Vet.Res.27 (1966) 339
- 4) Delbarre, F., Kahan, A., and Brouilhet, H.: Nuevas perspectivas en el tratamiento de los reumatismos inflamatorios. Rev.clinicEspan.,1 (1964)103
- 5) Wiesinger, D.: Impaired grip function as a test for anti-phlogistics. In: International symposium on Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs, Milan, Sept. 8-10. 1964, Garattini, S. and Dukes, M.N.G. eds., Int. Congr. Ser. No. 82, Excerpta Med. Found., Amsterdam, 1966, pp. 190-202.
- 6) Winter, C.A.: Anti-inflammatory testing methods: Comparative evaluation of indomethacin and other agent. In: International Symposium on Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs, Milan., sept.8-10, 1964, Garattini, S. and Dukes, M.N.G. eds., Int. Congr. Ser. No.82, Excerpta Med. Found., Amsterdam, 1966, pp. 190-202.
- 7) Niemegger, C.J.E., Verbruggen, F.J. and Janssen, P.A.J.: Effects of various drugs on carrageenin-induced oedema in the rat hind paw. J.Pharm. Pharmacol. 16 (1964) 810
- 8) Chen, G. et al., Bass, P., Purdon, R. and Rodney, G.: Interner Forschungsbericht, Parke, Davis & Co. 1961 und 1964
- 9) Winder, C.V., Wax, J., Serrano, B., Jones, E.M. and McPhee, M.L.: Anti-Inflammatory and antipyretic properties of N-(α - α - α -Trifluoro-m-tolyl)anthranilic acid (CL-440), flufenamic acid. Arthr. & Rheum., 6(1963) 36.

- 10) Blouin, L. and Williams, D.: Interner Forschungsbericht Parke, Davis & Co., 1964.
- 11) Collier, H.O.J. and Shorley, P.G.: Antagonism by mefenamic and flufenamic acids of the bronchoconstrictor action of Konins in the guinea-Pig. Brit.J. Pharmacol., 20 (1963) 345.
- 12) James, G.W.L., Piper, P.J., Dinneen, L.G., Shorley, P.G. and Collier, H.O.J.: Antagonism by meclofenamic and flufenamic acids of bronchoconstriction induced by bradykinin, SRS-A or antigen in the guinea-Pig in vivo: A summary of findings for Dunlop submission. Aug. 26, 1966.
- 13) Glazko, A.J. et al. Summary of studies on the physiological disposition of INF-1837 (CL-440). Interner Forschungsbericht, Parke, Davis & Co., July 25, 1962.
- 14) Glazko, A.J. Fenamates in Medicine, Supplement to Annals of Physical Medicine, London 1966.
- 15) McAlpine, R.J. Final preclinical report: Summary of toxicological studies of INF-1837 (Lot X-72467 in mice rats, dogs., and monkeys. Interner Forschungsbericht, Parke, Davis, Co. November 23, 1959.
- 16) Kaump, D.H. et al.: Bericht der Abteilung für klinische Forschung, Parke, Davis & Co (26. Juni 1964)
- 17) Kaump, D.H.: Fenamates in Medicine. Supplement to Annals of Physical Medicine, London 1966.
- 18) McAlpine, R.J. und Weston, K.: Interner Forschungsbericht, Parke, Davis & Co., 23. November 1959.
- 19) Kaump, D.H. et al.: Interner Forschungsbericht, Parke, Davis & Co., 11. Februar 1964
- 20) Kaump, D.H. et al.: Interner Forschungsbericht, Parke, Davis & Co., 27. August 1964.

- 21) Glazko, A.J. Summary of studies on the physiological disposition of INF-1837 (CL 440). Interner Forschungsbericht, Parke Davis & Co., 25. Juli 1962.
- 22) Glazko, A.J. Physiological disposition of CL-440 in animals and men. Interner Forschungsbericht, Parke, Davis & Co., 5. Mai 1964
- 23) Glazko, A.J. Fenamate in Medicine. Supplement to Annals of Physical Medicine, London 1966.
- 24) Gauch, R.P. Tabulation of data received from Dr. A.R. Stough on changes in pertinent clinical and laboratory response variables in human subjects during three(3) CL-440 oral dosing regimes. Unpublished report to Me. Dept. of clinical investigation, Parke, Davis & Co., October 14, 1960.
- 25) Gauch, R.R. Summarization of data from Protocol 445. (A study to determine human tolerance to higher doses (800-1,400 mg/day, of CL-440 and comparison against Placebo). Unpublished report to Me. Dept. of clinical investigation, Parke, Davis & Co., October, 24, 1962.
- 26) de Gaires, P.F.E. Interim report by Dr. Bollet, Charlottesville on his study of CL-440 in rheumatoid arthritis. Unpublished report to Me. Dept. of clinical investigation, Parke, Davis & Co. July, 31, 1961.
- 27) Goodley, O.H. Evaluation of drug therapy in rheumatoid arthritis- study of pafenamic acid, Western Med. 4:225 (1963)
- 28) McCarty, D.J. Unpublished report to the Dept. of clinical investigation, Parke, Davis & Co., December 4, 1962.
- 29) Gauch, R. and Wilfong, C. Summarization of Protocol 447 (A study to determine the tolerance and efficacy of 300 and 600 mg/day of CL-440 in rheumatoid arthritis in a pilot, uncontrolled trail, Unpublished report to the Dept. of clinical investigation, Parke, Davis & Co., December 17, 1962.
- 30) Lansbary, J. Study on the effect of CL-440 in rheumatoid

arthritis done at the Arthritis clinic at the Temple University Hospital Jan.-Apr. Unpublished Report to the Dept. of clinical investigation, Parke, Davis & Co., March 31, 1964.

- 31) Mathies, H. und W. Eichhorn, München
Beurteilung der therapeutischen Wirkung der Flufenaminsäure bei Patienten mit chronischer Polyarthrititis im Doppelblindversuch. Med. Mschr., 21. Jahrgang, Heft 11, November 1967.
- 32) Bagnall, A.W. Report of toxic effects of CL-440 in rheumatoid arthritis. Unpublished report to the Dept. of investigation, Parke, Davis & Co., July 31, 1964.
- 33) Lansbury, J. Personal communication to A. Sheperdigian. Unpublished report to the Dept. investigation, Parke, Davis & Co., April 27, 1961.
- 34) Gauch, R.R. Summarization of data from Protocol 108 (A protocol outlining a method for studying the effectiveness of CL-356 (150 mg/daily for 56 days), CL-440 (150 mg/daily for 28 days) and cross-over with placebos for 28 days and CL-196 (50 mg/daily for 56 days) in rheumatoid arthritis. Unpublished report to the Dept. investigation, Parke, Davis & Co., September 6, 1961.
- 35) Gauch, R.R. Summarization of data on Protocol 317 (A study of the efficacy of CL-440 in rheumatoid arthritis compared with aspirin) Unpublished report to the Dept. investigation, Parke, Davis & Co., January 29, 1962.
- 36) Gauch, R.R. Summarization of data from Protocol 478 (A study to determine the efficacy of and tolerance to 800 mg/day CL-440 in rheumatoid arthritis and to compare this regimen with 1,800 mg/day of aspirin) Unpublished report to The Dept. investigation Parke, Davis & Co., December 28, 1962.
- 37) Mathies, H. Rheumatismus als Permeabilitätsproblem. Med. Klin. 52, 1676 (1957)
- 38) Mathies, H. Die Hyaluronidasehemmung als therapeutischer

Effekt der Rheumatismusbehandlung. Fortschr. d. Med. 74, 35 (1956)

39) Mathies, H. Neuere Untersuchungen zur Wirkungsweise der Hyaluronidasehemmung durch Antirheumatika. Verh. Dtsch. Ges. f. Inn. Med. 65 Kongr. 1959

40) Mathies, H. Hyaluronidaseaktivitätsbestimmungen als Untersuchungsmethode zur Differenzierung der Wirkungen verschiedener Pharmaka. Arch. exp. Path. Pharmacol. 240, 31 (1960)

41) Mathies, H., Glück, A., Poulantzas, J. und Schmidt, D. Blockierung der Hyaluronidasehemmung durch Ergotamintartrat. Med. Exp. 1, 64 (1959)

42) Mathies, H. und Vogel, M. Untersuchungen am Menschen zur hyaluronidasehemmenden Wirkung des Phenylbutazons und deren Blockierung durch Adrenolytika, Antihistaminika und heparinaktivierenden Substanzen. Zschr. ges. exp. Med. 133, 32 (1960)

Herrn Professor Dr. W. Seitz möchte ich für die Überlassung des Themas und Übernahme des Referates danken.

Herrn Dr. H. Mathies danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit und für die Ratschläge während der Versuche und während der Abfassung der Arbeit. Herrn Dipl.-Math. Dr. V. Rahlfs bin ich für die Bearbeitung der statistischen Auswertung sehr dankbar.

Lebenslauf

Am 24.10.1942 wurde ich als Tochter des Amtsgerichtsrats Georges Schuster und seiner Ehefrau Ilse, geb. Vollrath, in Apolda geboren. Von Ostern 1949 bis Ostern 1953 besuchte ich die Volksschule in Köln und von 1953 bis 1962 das Mädchengymnasium "Kaiserin-Augusta-Schule" in Köln. Dort machte ich im Februar 1962 das Abitur.

In Köln begann ich im Sommersemester 1962 mit dem Studium der Zahnmedizin und bestand dort im Herbst 1964 die zahnärztliche Vorprüfung. Nach dem ersten klinischen Semester setzte ich mein Studium in Berlin fort, wo ich im August 1967 die zahnärztliche Prüfung bestand.

BAMBERGER FOTODRUCK - RUDOLF RODENBUSCH
8600 BAMBERG-Markusplatz 22 - Telefon : 0951/62794